

PCT/FR 3 / 0 1 4 9 5

17 JAN. 1996

**INPI**

INSTITUT  
NATIONAL DE

**PRIORITY DOCUMENT**

REC'D 09 APR 1996

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

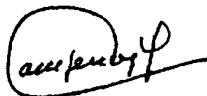
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 NOV. 1995

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef de Division



Yves CAMPENON

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**

**SIEGE**  
26 bis. rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone (1) 42 94 52 52  
Telecopie (1) 42 93 59 30



## REQUÊTE

EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \*

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, préciser NATURE N et DATE DE LA  
demande initiale

## 2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT  
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE  
DU RAPPORT DE RECHERCHE \*☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET  
SI LE DEMANDEUR EST UNE  
PERSONNE PHYSIQUE IL  
REQUIERT LE PAIEMENT  
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE  
DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

14. NOV 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 13606 -

DATE DE DÉPÔT

14 NOV. 1994

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75008

4 NUMÉRO DU PERMIS PERMANENT

29 OCTOBRE 1990

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

JB/FT D 4300

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

43 87 83 10

## 7 TITRE DE L'INVENTION

ADJUVANT POUR COMPOSITION VACCINALE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins

société anonyme

9 ADRESSE(S) COMPLETE(S)

58 AVENUE LECLERC

69007 - LYON

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANÇAISE

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSEES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☒ DE REVENDICATION (à partir de la 11<sup>e</sup>)

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE  
INVENTEUR☐ OUI

S'il s'agit d'un inventeur unique

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE  
PHYSIQUE NON IMPOSABLE IL  
REQUIERT QU'IL A RECUS LA RÉDUCTION  
DES REDEVANCES \*☐ OUI☐ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA  
PRÉSENTE DEMANDE

N

N

N

N

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE N° D'INSCRIPTION

CABINET BERNASCONI ET VIGIER (l'un deux)

SIGNATURE DU PROPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(s) le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur

N° d'enregistrement national

94 13606

Titre de l'invention

Adjuvant pour composition vaccinale.

Le (s) soussigné (s)

PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins  
58 Avenue Leclerc  
69007 LYON FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

Jean HAENSLER  
17, rue J. Piccandet  
69290 St Genis les Ollières  
FRANCE

Emmanuelle TRANNOY  
4, rue Pauline Marie Jaricot  
69005 Lyon  
FRANCE

Jorge RONCO  
30, rue G. Martin Witkowski  
69005 Lyon  
FRANCE

Date et PARIS, le 03.08.1995  
signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

CABINET LAVOIX

M. MONCHENY N°92 1179

*N. Monchény*

5

## Adjuvant pour composition vaccinale

10

La présente invention est relative au domaine des compositions vaccinales. Plus particulièrement, l'invention concerne de nouveaux adjuvants utilisés pour augmenter l'immunogénicité de compositions vaccinales.

15

Il existe une grande quantité d'antigènes qui, injectés chez l'animal, vont provoquer une fabrication d'anticorps qui leur sont spécifiques. Un des principes de la vaccination est de stimuler la fabrication d'anticorps par l'organisme d'un homme ou d'un animal, en lui administrant des antigènes choisis. Les anticorps ainsi fabriqués permettront, ensuite, à l'organisme de se défendre contre une infection ultérieure. Cependant, certains

20

antigènes n'entraînent pas de stimulation suffisante du système immunitaire lorsqu'ils sont administrés seuls. Il est donc nécessaire de leur adjoindre un adjuvant qui va permettre d'augmenter la réponse immunitaire de l'organisme afin d'obtenir une quantité d'anticorps suffisante pour être protectrice.

25

Parmi les adjuvants connus, on peut citer l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium qui sont utilisés habituellement dans les vaccins humains. Cependant, ces composés ne possèdent pas de propriété adjuvante vis-à-vis de tous les antigènes. Ils ne permettent notamment pas d'augmenter l'immunogénicité du vaccin contre la grippe.

30

Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'adjuvants qui permettent d'augmenter l'immunogénicité des antigènes administrés dans une composition vaccinale, sans aucun risque de toxicité.

35

Pour atteindre ce but, l'invention propose un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire, pour son utilisation comme adjuvant dans l'administration d'une composition vaccinale.

40

L'invention a également pour objet une composition vaccinale comprenant au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire pour la fabrication d'une composition vaccinale.

10 L'invention a encore pour objet un produit contenant au moins un antigène et un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en vaccination.

15 Un autre objet de l'invention est une méthode d'induction d'une réponse immunitaire chez un mammifère, consistant à administrer au mammifère au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer en outre au moins un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.

20 Au sens de la présente invention, le terme amphipathique désigne un composé qui possède à la fois une portion hydrophobe et une portion hydrophile.

25 Parmi les dérivés de stérol pouvant conduire aux composés selon l'invention, on peut citer le cholestérol, le phytostérol, l'ergostérol. Les dérivés de cholestérol conviennent particulièrement bien.

30 Le groupement polaire des composés amphipathiques selon l'invention peut être constitué par un groupement anionique, un groupement cationique ou un groupement saccharidique. Un groupement cationique tel qu'un ammonium quaternaire ou une amine protonable est particulièrement adapté.

35 Le groupement lipophile est relié au groupement polaire grâce à une liaison ester, éther, amide ou carbamoyle parmi lesquelles les liaisons ester, amide et carbamoyle présentent l'avantage d'être hydrolysables dans la cellule.

La liaison entre les 2 groupements est réalisée de préférence par l'intermédiaire d'un bras espaceur constitué par une chaîne alkylique linéaire ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.

40 Parmi les composés convenant aux fins de l'invention, on peut citer :

-l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,

- 5       - la cholestéryl-3 $\beta$ -carboxyamidoéthylèneamine,
- l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,
- le 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol,
- 10       - le 3 $\beta$ -[N-(polyéthylèneamine)-carbamoyl]-cholestérol.

parmi lesquels le 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol est particulièrement avantageux.

15       Les composés amphipathiques selon l'invention peuvent être obtenus par condensation entre un dérivé de stérol et un composé à groupement polaire, selon une des méthodes décrites dans "Advanced Organic Chemistry" Part B : Reactions and Synthesis (F.A. Carey and R.J. Sundberg - Plenum Publishing Corp.). Plus

20       particulièrement, on peut réaliser certains des composés selon l'invention selon les méthodes décrites dans le brevet US 5 283 185.

      Les composés amphipathiques obtenus en solution alcoolique peuvent, ensuite, être dispersés dans de l'eau ou dans un tampon aqueux et conduire à une suspension de

25       micelles ou de liposomes. Avantageusement, les composés amphipathiques de l'invention sont associés à un lipide neutre tel qu'un phospholipide, par exemple la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC). Cette association conduit les composés amphipathiques selon l'invention à s'organiser sous

30       forme de liposomes plutôt que de micelles lors de la phase de dispersion dans un environnement aqueux. La proportion molaire de lipide neutre associé aux composés amphipathiques est, de préférence, supérieure à 20 %.

      Les produits obtenus selon l'invention n'ont conduit à aucune réaction de toxicité aigüe lors de leur inoculation à des souris.

35       L'antigène utilisé pour induire une réponse immunitaire protectrice est constitué par n'importe quel antigène utilisé habituellement dans une composition vaccinale, que ce soit seul ou en combinaison avec un autre antigène. De façon particulière, les composés amphipathiques selon l'invention se révèlent de bons immuno-adjuvants lorsqu'ils sont

40       associés au vaccin contre le virus de la grippe qui comprend notamment : la protéine HA qui est une hémagglutinine située à la surface de l'enveloppe du virus Influenza, la

5 protéine NP qui est une nucléoprotéine de capsidie liée à l'ARN viral et une protéine M  
ou "matrice" protéique de l'enveloppe.

L'association entre l'antigène dont on veut accroître l'immunogénicité et la  
suspension micellaire ou liposomale de composés amphipathiques est réalisée  
10 spontanément par interaction hydrophobe et électrostatique lors du mélange des  
constituants.

Les compositions vaccinales obtenues présentent une bonne stabilité. Cependant, la  
suspension liposomale semble préférable à la suspension micellaire.

15

En outre, la suspension liposomale est stérilisable par filtration et lyophilisable.

Il est évident qu'il est possible d'ajouter aux compositions vaccinales obtenues des  
éléments utilisés classiquement dans les vaccins, tels que de l'eau, du sérum  
20 physiologique ou une substance tampon.

L'administration des compositions vaccinales obtenues selon l'invention peut être  
effectuée par toutes les voies habituellement utilisées pour l'administration de vaccins et,  
notamment, par voie sous-cutanée.

25

Il est possible d'administrer, de façon séparée, la composition comprenant  
l'antigène et la composition contenant les composés amphipathiques selon l'invention ;  
cependant, l'administration d'une composition liposomale de composés amphipathiques  
selon l'invention associés à l'antigène permet non seulement d'augmenter la réponse  
30 immunitaire de type humorale, mais aussi d'induire des lymphocytes T cytotoxiques  
spécifiques.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs qui  
suivent, en référence aux figures.

35

La figure 1 illustre le schéma de réaction de la fabrication du DC chol. Les figures  
2 à 6 illustrent les résultats des tests d'induction des lymphocytes T cytotoxiques pour  
chaque groupe de souris mentionné à l'exemple 8.

40

5 Exemple 1 : synthèse de 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-  
cholestérol (DC chol) 2,3 mg

Le DC chol est synthétisé par réaction de cholestéryl chloroformate et de N,N-diméthyléthylènediamine selon le schéma de la figure 1, ainsi que cela est décrit dans  
10 l'article de X. Gao et L. Huang (BBRC 179 (1) : 280-285).

Une solution de cholestéryl chloroformate (2,25 g, 5 mmol dans 5 ml de chloroforme sec) est ajoutée goutte à goutte à une solution en excès de N,N-diméthyléthylènediamine (2 ml, 18.2 mmol dans 3 ml de chloroforme sec) à 0°C. Après  
15 extraction du solvant par évaporation, le résidu est purifié par 2 recristallisations successives dans de l'éthanol absolu à 4°C et séché sous vide. On obtient alors 0,545 g de DC chol sous forme de poudre blanche. La structure du composé a été vérifiée par RMN et spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont conformes aux données publiées dans l'article cité ci-dessus.

20

Exemple 2 : préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 2,3 mg

30 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1 sont dissous dans 100  $\mu$ l d'éthanol.  
25 75  $\mu$ l de la solution ainsi obtenue sont injectés par l'intermédiaire d'une seringue Hamilton dans 3 ml d'eau maintenue sous agitation à 45°C. Après 5 minutes d'agitation supplémentaire à 45°C, la suspension micellaire obtenue est mélangée à 200  $\mu$ l du vaccin monovalent contre le virus de la grippe (souche A Singapour) comprenant notamment comme antigènes : l'hémagglutinine HA, la nucléoprotéine NP et la protéine M.

30

Le mélange obtenu est fractionné en doses vaccinales de 0,3 ml. Chaque dose comprend 5 $\mu$ g de HA et 2,3 mg de DC chol.

35 Exemple 3 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 0,45 mg

On procède comme dans l'exemple 2 en partant de 6 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1.

40



5 **Exemple 4 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à du dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE)**

On mélange 18 mg de dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) et 4,5 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1, que l'on met en solution dans 3 ml de chloroforme.

10

Le chloroforme est évaporé sous vide pour constituer un film lipidique qui est soumis à dessiccation sous vide, puis remis en suspension dans 3 ml d'eau.

15 Après hydratation pendant 24 heures à 4°C, la dispersion est soumise à sonication pendant 5 à 10 minutes dans un bain à ultra-sons (Laboratory Supplies - Hicksville - N.Y.) pour former des liposomes.

Cette suspension est stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

20 **Exemple 5 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à du dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC)**

On procède comme dans l'exemple 4 en remplaçant les 18 mg de DOPE par 18 mg de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC):

25

On obtient une suspension liposomale stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

**Exemple 6 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPE**

30

3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 4 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour contenant l'équivalent de 50 µg de l'antigène constitué par l'hémagglutinine HA.

35

Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml, comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

**Exemple 7 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPC**

40

3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 5 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour.

- 5 Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

**Exemple 8 : Immunisation**

- 10 On immunise 5 groupes de 4 souris Balb/c par 3 injections sous-cutanées effectuées à J0, J21 et J36 avec les compositions vaccinales suivantes :

Groupe A : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/ Singapour dilué à 5 µg de HA dans 0,3 ml de PBS,

15

Groupe B : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 2,

Groupe C : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 3,

20

Groupe D : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 6,

Groupe E : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 7.

**Exemple 9 : Dosage en anticorps anti-HA**

25

Afin d'effectuer les dosages en anticorps neutralisants, on prélève les sérums de souris à J21, J36 et J51 et on effectue le titrage en anticorps anti-HA grâce à la technique d'inhibition de l'hémagglutination induite par le virus de la grippe.

30

Le tableau 1 ci-dessous illustre les résultats obtenus pour chaque groupe de souris après une injection et le tableau 2 les résultats après 2 injections.

Tableau 1

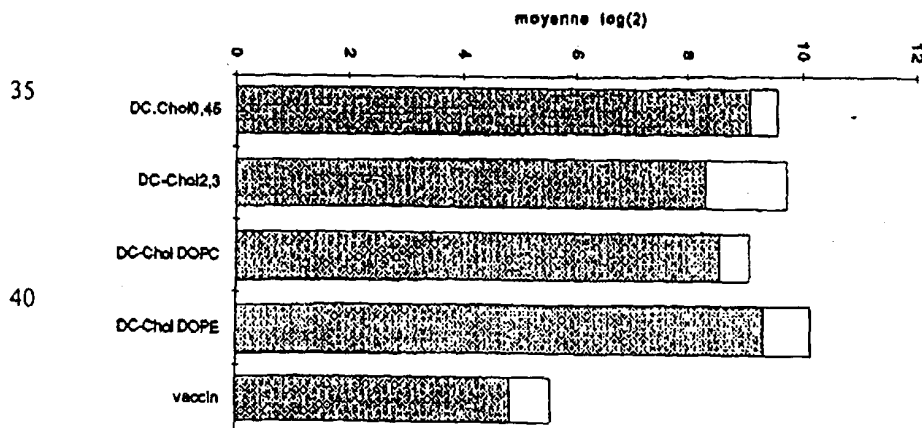
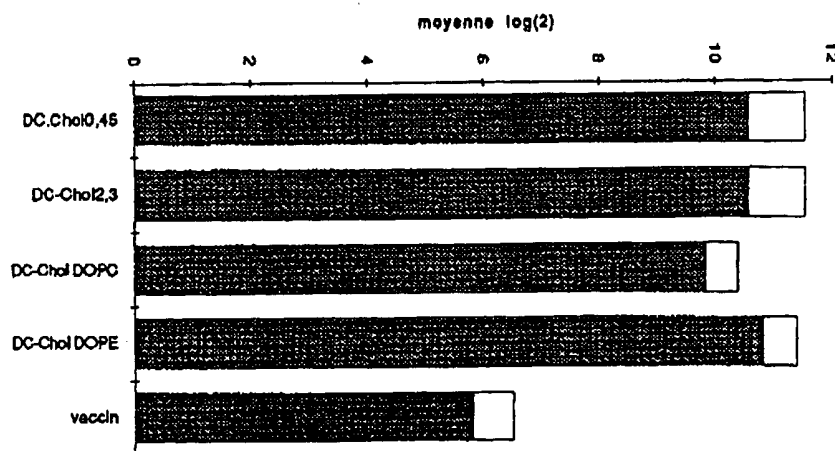


Tableau 2

5

10

15



20

Les titres d'anticorps neutralisants dans les sérums des souris sont présentés en log2 de la dilution la plus forte induisant l'inhibition de l'hémagglutination.

25

Ces résultats montrent clairement le rôle d'adjuvant joué par le DC chol. En effet, le taux d'anticorps anti-HA est nettement plus élevé pour les lots de souris ayant reçu du DC chol comparativement aux souris ayant reçu le vaccin sans adjuvant (Groupe A).

30

Il est important de noter que les taux d'anticorps neutralisants dans les groupes B, C, D et E sont supérieurs au taux d'anticorps neutralisants dans le groupe A même après une injection unique des différentes compositions vaccinales. Ces titres augmentent encore légèrement et se stabilisent après la deuxième injection. Les résultats obtenus après la 3ème injection sont sensiblement égaux à ceux de la 2ème injection (non représentés).

35

Des essais réalisés avec un vaccin grippe trivalent comprenant la souche A Texas, la souche B Panama et la souche A Beijing ont également démontré le pouvoir adjuvant du DC chol.

#### Exemple 10 : Mise en évidence de l'induction de cellules T cytotoxiques

40

On prélève à J51 les cellules spléniques des souris de chacun des groupes mentionnés à l'exemple 7.

5 Ces cellules effectrices sont restimulées in vitro en présence de cellules stimulantes syngéniques infectées par le virus de la souche A/ Singapore correspondant au vaccin testé. La fonction cytotoxique spécifique de ces cellules stimulées est mise en évidence en utilisant comme cellules cibles la lignée de mastocytomes P815 sensibilisés par incubation avec un peptide épitope CTL de l'hémagglutinine du virus (réponse spécifique  
10 contre la HA) ou avec un peptide épitope CTL de la nucléoprotéine du virus (réponse spécifique contre la NP). La lyse non spécifique (bruit de fond) est mesurée sur des cellules P815 non sensibilisées ou sensibilisées avec un peptide épitope CTL du virus HIV (V3MN).

15 La lyse des cellules cibles est mesurée par une technique radioactive basée sur le chargement des cellules cibles en CR-51 et sur le relargage de ce radioélément lors de la lyse cellulaire.

20 Les résultats présentés sur les figures 2 à 6 qui illustrent le pourcentage de cytotoxicité en fonction du rapport cellules effectrices sur cellules cibles pour chacun des groupes de souris testés, montrent qu'il est particulièrement avantageux d'utiliser une composition liposomale de DC chol, car celle-ci permet d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques en plus de la réponse immunitaire de type humoral obtenue grâce à l'action adjuvante du DC chol.

25

5

### Revendications

10

15

20

25

30

35

40

1. Composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire, pour son utilisation comme adjuvant dans l'administration d'une composition vaccinale.
2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
3. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le groupement polaire est un groupement cationique.
4. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le groupement polaire est un ammonium quaternaire ou une amine protonable.
5. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le groupement lipophile est relié au groupement polaire par une liaison ester, éther, amide ou carbamoyl.
6. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le groupement lipophile est séparé du groupement polaire par une chaîne alkylique ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.
7. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les composés suivants :
  - l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,
  - la cholestéryl-3 $\beta$ -carboxyamidoéthylèneamine,
  - l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,
  - le 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol,
  - le 3 $\beta$ -[N-(polyéthylèneamine)-carbamoyl]-cholestérol.
8. Composé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit du 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol.

- 5     9. Composé selon une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est associé à un lipide neutre.
- 10    10. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la proportion de lipide neutre associé est d'au moins 20 % en mole.
11. Composé selon une des revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le lipide neutre associé est la dioleoyl phosphatidyléthanamine (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC).
- 15    12. Composé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est dispersé dans un environnement aqueux sous forme de liposomes.
- 20    13. Utilisation d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire pour la fabrication d'une composition vaccinale.
14. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
- 25    15. Utilisation selon une des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce que le groupement polaire est un groupement cationique.
- 30    16. Utilisation de  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol pour la fabrication d'une composition vaccinale.
17. Utilisation comme adjuvant dans l'administration d'un vaccin d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.
- 35    18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est le  $3\beta$ -[N-(N', N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol.
- 40    19. Utilisation selon une des revendications 17 ou 18, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.

- 5 20. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.
- 10 21. Composition vaccinale selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
22. Composition vaccinale selon une des revendications 20 ou 21 caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est le  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol.
- 15 23. Composition vaccinale selon une des revendications 20 à 22, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique se présente sous forme de liposomes incluant au moins un antigène.
- 20 24. Composition vaccinale selon une des revendications 20 à 23, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
- 25 25. Composition vaccinale selon une des revendications 20 à 24, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène du virus de la grippe.
- 26 26. Produit contenant au moins un antigène et un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en vaccination.

**BERNASCONI et VIGIER**  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS

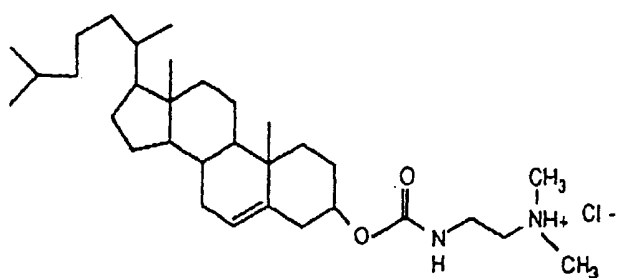
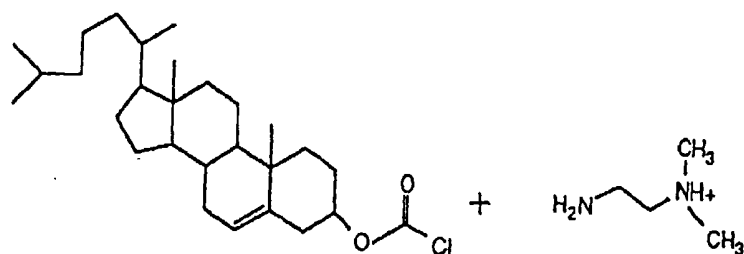


FIGURE 1

*BERNASCONI et VIGIER*  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS



## Souris Balb/c Immunisées avec du vaccin

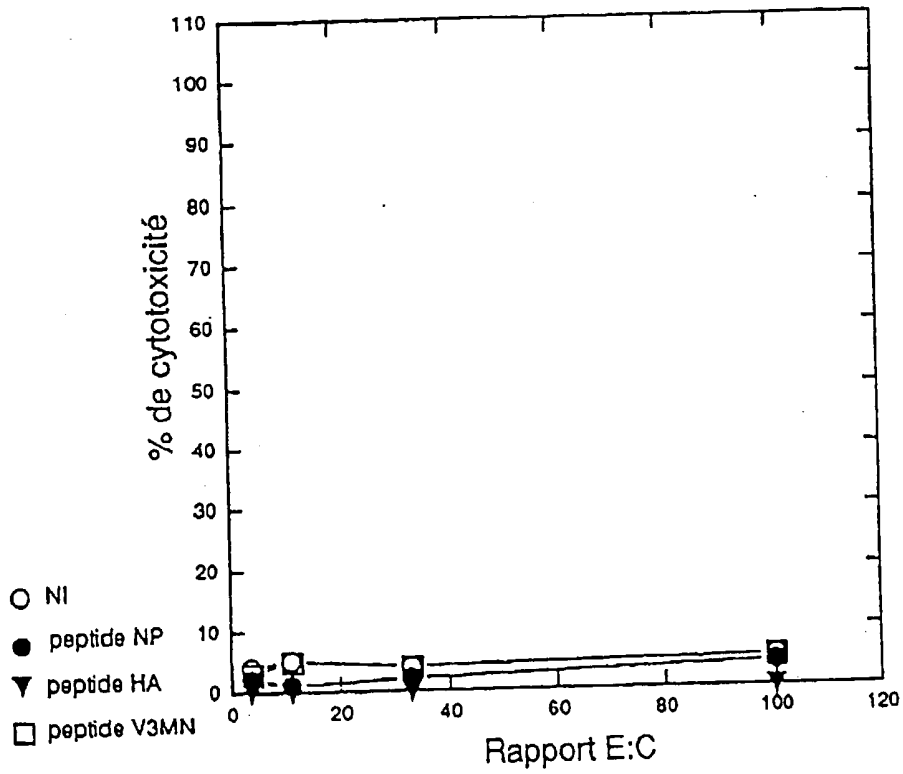


FIGURE 2

**BERNASCONI et VIGIER**  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS

Souris Balb/c immunisées avec DC-CHOL 2,3mg

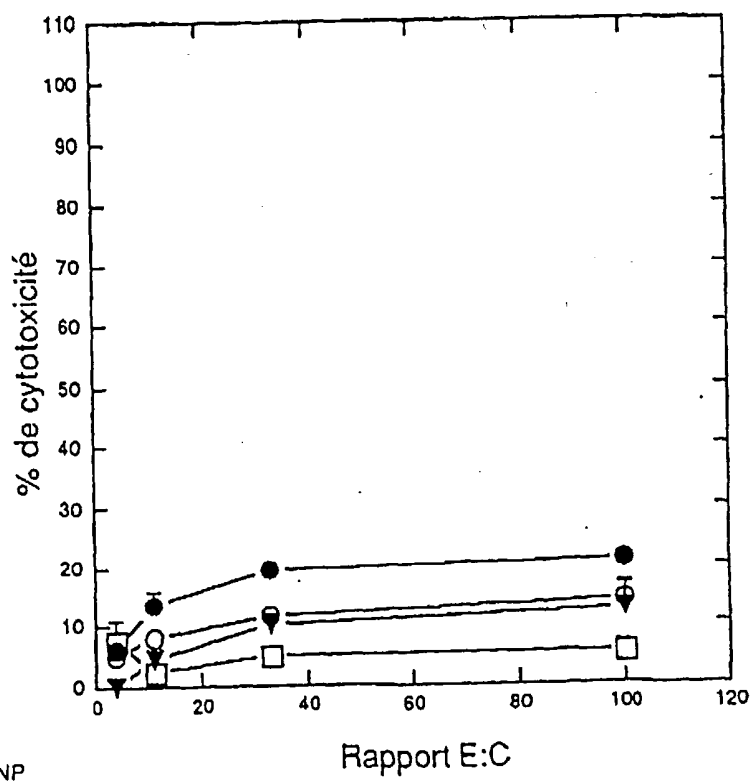


FIGURE 3

BERNASCONI et VIGIER  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS

Souris Balb/c Immunisées avec DC-Chol 0,45 mg

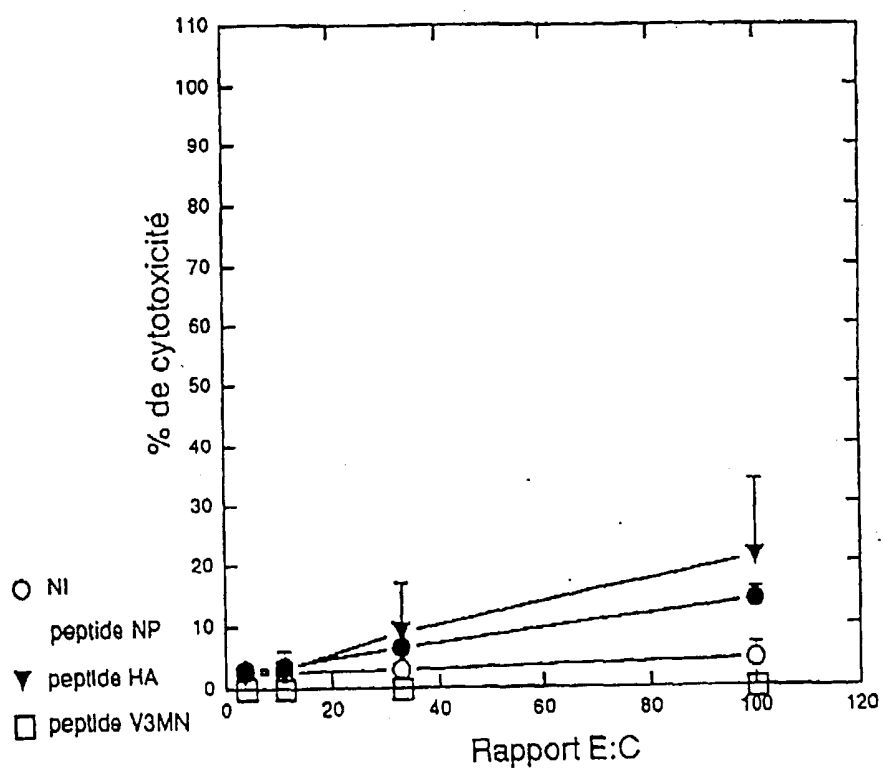


FIGURE 4

BERNASCONI et al.  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS

Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes- DC CHOL DOPE

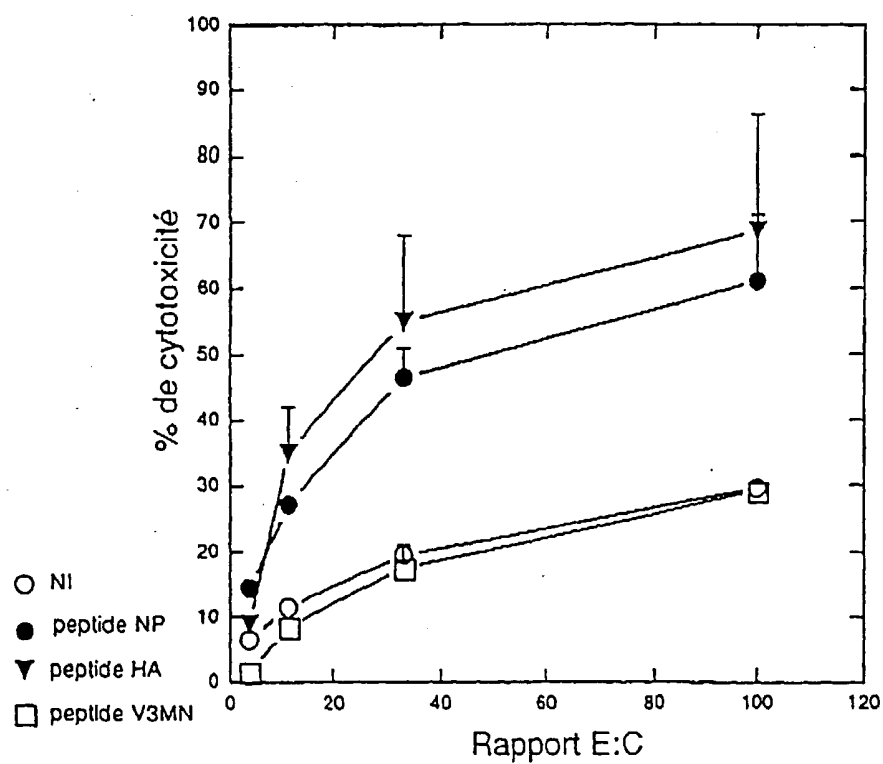


FIGURE 5

**BERNASCONI et VIGIER**  
13, bd des Batignolles  
75008 PARIS

## Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes DC CHOL- DOPC

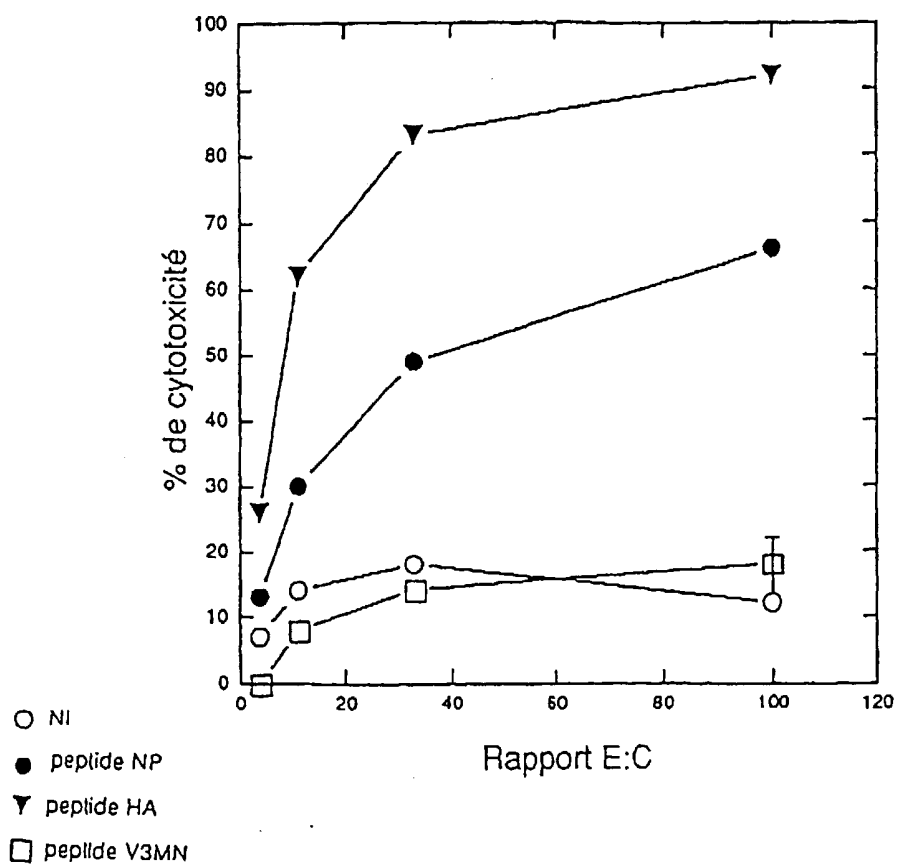


FIGURE 6